

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2005年8月25日 (25.08.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/078449 A1

(51) 国際特許分類⁷: G01N 33/68, 27/447, 27/62, C12Q 1/68 // C12N 15/09, C12P 21/02 (74) 代理人: 清水 初志, 外(SHIMIZU, Hatsuhi et al.); 〒3000847 茨城県土浦市卸町 1-1-1 関鉄つくばビル 6 階 Ibaraki (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2005/001858

(22) 国際出願日: 2005年2月8日 (08.02.2005)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2004-038647 2004年2月16日 (16.02.2004) JP

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ株式会社 (HUMAN METABOLOME TECHNOLOGIES INC.) [JP/JP]; 〒9970015 山形県鶴岡市末広町 5 番 22-2 O 1 Yamagata (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 富田 勝 (TOMITA, Masaru) [JP/JP]; 〒9970035 山形県鶴岡市馬場町 14-1 慶應義塾大学鶴岡タウンキャンパス内 Yamagata (JP). 伊藤 文 (ITOH, Aya) [JP/JP]; 〒9970035 山形県鶴岡市馬場町 14-1 慶應義塾大学鶴岡タウンキャンパス内 Yamagata (JP). 曾我 朋義 (SOGA, Tomoyoshi) [JP/JP]; 〒9970035 山形県鶴岡市馬場町 14-1 慶應義塾大学鶴岡タウンキャンパス内 Yamagata (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ヨーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 國際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドノート」を参照。

(54) Title: METHOD AND KIT FOR IDENTIFYING THE FUNCTION OF GENE PRODUCT AND IDENTIFYING BINDING SUBSTANCE

(54) 発明の名称: 遺伝子産物の機能同定及び結合物質同定のための方法及びキット

(57) Abstract: [PROBLEMS] To provide a method and a kit for identifying the function of a gene product having an unknown function and a method and a kit for identifying a binding substance which are widely applicable to organism species over a broad scope. [MEANS FOR SOLVING PROBLEMS] At least one gene product is added to a compound cocktail (for example, a metabolic system compound cocktail comprising all of the materials to be metabolized, coenzymes and so on participating in a certain metabolic system) and reacted therewith and then a change occurring in the compound cocktail is detected. Thus, the function of the gene product can be identified or a substance binding thereto can be identified.

(57) 要約: [課題] 本発明は、広範な生物種に対し応用範囲の広い、機能が未知である遺伝子産物の機能同定のための方法及びキット、ならびに結合物質同定するための方法及びキットを提供することを目的とする。[解決手段] ある代謝系に関わる全ての代謝物質や補酵素などを添加した代謝系化合物カクテルなどの化合物カクテルに、少なくとも一つの遺伝子産物を添加して反応させ、該化合物カクテルに生じる変化を検出することにより、該遺伝子産物の機能同定や結合物質同定が可能になる。

WO 2005/078449 A1

明 細 書

遺伝子産物の機能同定及び結合物質同定のための方法及びキット 技術分野

[0001] 本発明は、機能が未知である遺伝子産物の機能同定のための方法及びキット、ならびに結合物質同定のための方法及びキットに関する。

背景技術

[0002] 遺伝子産物の機能を明らかにするために、様々な遺伝学的手法が用いられている。例えば、培養細胞あるいは動物個体で、アンチセンスRNA、RNAi、dn(ドミナント・ネガティブ)型遺伝子産物を発現させたり、遺伝子をノックアウトしたりすることにより解析目的の遺伝子を破壊したり、ウイルスベクターやプラスミドベクターなどの強制発現ベクターを用いて強制発現させたりすることにより、それらの遺伝子操作の効果を調べるというものである。この際、これらの遺伝子操作の効果を調べるには、遺伝子操作の有無で、その形質を比較すればよい。

[0003] 例えば、組織学的解析(組織切片観察や免疫染色など)によって形態やマーカー発現の変化を調べたり、生化学的解析(抽出物の酵素活性測定など)によって生化学的活性の変化を調べたり、分子生物学的解析(ディファレンシャル・ディスプレイなど)によって発現している遺伝子の変化を調べたりすることができる(例えば、非特許文献1参照)。

非特許文献1:Andersson U., Levander F.及びRadstrom P.、「Trehalose-6-phosphate Phosphorylase Is Part of a Novel Metabolic Pathway for Trehalose Utilization in *Lactococcus lactis*」、Journal of Biological Chemistry(米国)、2001年、276巻、46号、p. 42707-42713

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0004] しかし、細胞や個体を用いた系は非常に複雑であり、遺伝子操作の効果を調べるのは容易ではない。また、上記遺伝子操作も、適応できる生物種は限られている。そこで、本発明は、広範な生物種に対し応用範囲の広い、機能が未知である遺伝

子産物の機能同定のための方法及びキット、ならびに結合物質同定のための方法及びキットを提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0005] 本発明の遺伝子産物の機能同定方法においては、少なくとも一つの遺伝子産物を化合物カクテルに添加して反応させ、該化合物カクテルに生じる変化を検出することにより、該遺伝子産物の機能を同定する。一態様において、本発明の遺伝子産物の機能同定方法は、少なくとも一つの遺伝子産物を化合物カクテルに添加する工程、該化合物カクテルをインキュベートする工程、該化合物カクテルから遺伝子産物を除去する工程、及び該化合物カクテルに含まれる化合物の変化を検出する工程を含む。

[0006] さらに、本発明の遺伝子産物の機能同定方法において、該遺伝子産物をコードする少なくとも一つの遺伝子を発現させることにより、前記少なくとも一つの遺伝子産物を得る工程を含んでもよい。

[0007] 本発明の方法において、化合物カクテルから、夾雜物(例えば、添加した遺伝子産物などのタンパク質)を除去するためには、物質を精製するために用いられる任意の方法、例えば限外濾過フィルター、クロマトグラフィーカラム、塩析、溶媒沈殿、溶媒抽出、蒸留、免疫沈降、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動法、透析、再結晶等を用いることができる。

[0008] また、本発明において、化合物の変化の検出は、(a) 遺伝子産物を処理した化合物カクテルに含まれる各化合物の量を測定する工程、(b) 遺伝子産物を添加しない以外は、同じ条件下で反応させた化合物カクテルに含まれる各化合物の量を測定する工程、ならびに(c) 工程(a)及び(b)において測定された化合物の量を比較し、量的に変化した化合物を同定する工程によって行うことができる。前記化合物の同定及び量の測定のために、キャピラリー電気泳動-質量分析装置(CE/MS)、液体クロマトグラフィー-質量分析装置(LC/MS)、ガスクロマトグラフィー-質量分析装置(GC/MS)、フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析装置(FT-ICR-MS)、核磁気共鳴装置(NMR)などの分析装置を用いることができるが、これらに限定されることはない。本発明において、このように量的に変化した化合物を同定することによつ

て、添加した遺伝子産物の機能を推定することができる。

[0009] さらに、本発明の結合物質同定方法においては、少なくとも一つの遺伝子産物を化合物カクテルに添加して反応させ、該化合物カクテルに生じる変化を検出することにより、該遺伝子産物に結合する結合物質を同定する。一態様において、本発明の結合物質同定方法は、少なくとも一つの遺伝子産物を化合物カクテルに添加する工程、該化合物カクテルをインキュベートする工程、該化合物カクテルから、遺伝子産物及び該化合物カクテルに含まれる化合物と該遺伝子産物の結合物を除去する工程、該化合物カクテルに含まれる化合物の変化を検出し、該化合物カクテル中で減少した化合物を同定する工程を含む。

[0010] ここで、上記工程によって同定された量が減少した化合物は、遺伝子産物の結合物質である可能性が高い。従って、本発明の結合物質同定方法は、該化合物カクテルから、該化合物カクテルに含まれる化合物と該遺伝子産物の結合物を単離し、該遺伝子産物に結合した化合物を同定する工程をさらに含んでもよい。

[0011] 本発明において、遺伝子産物の機能同定のためのキットは、化合物カクテルを含むこと以外には特に制限はなく、例えば、遺伝子産物または化合物カクテルに添加される緩衝液、化合物カクテル中の特定の化合物と反応することが既知である標準物質、反応容器、化合物の変化を検出するための試薬、及び指示書等を含んでもよい。本発明のキットを用いて、少なくとも一つの遺伝子産物を化合物カクテルに添加して反応させ、該化合物カクテルに生じる変化を検出することにより、該遺伝子産物の機能を同定することができる。

[0012] 本発明において、遺伝子産物の結合物質同定のためのキットは、化合物カクテルを含むこと以外には特に制限はなく、例えば、遺伝子産物または化合物カクテルに添加される緩衝液、化合物カクテル中の特定の化合物と結合することが既知である標準物質、反応容器、化合物の変化を検出するための試薬、及び指示書等を含んでもよい。本発明のキットを用いて、少なくとも一つの遺伝子産物を化合物カクテルに添加して反応させ、該化合物カクテルに生じる変化を検出することにより、該遺伝子産物の結合物質を同定することができる。

[0013] 本明細書において、「化合物カクテル」とは、所定の反応系に関して、その反応系

に属する反応を起こすのに必要な基質・補酵素・イオンや反応によって生じる生成物などの低分子化合物などを広く含有した溶液のことをいう。化合物カクテルは、代謝系化合物カクテルまたは細胞抽出物であってもよい。

代謝系化合物カクテルの例として、解糖系化合物カクテルやTCA回路化合物カクテルなどが挙げられる。

[0014] 代謝系化合物カクテルに含まれる化合物には、例えば、解糖系、TCA回路、ペントースリン酸回路に関わる化合物が含まれ、例えば、フルクトース1, 6リン酸、6リン酸グルコネート、2, 3リン酸グリセレート、グルコース1リン酸、フルクトース6リン酸、グルコース6リン酸、リブロース5リン酸、リボース5リン酸、エリスロース4リン酸、イソクエン酸、クエン酸、2リン酸グリセレート、3リン酸グリセレート、シスアコニット酸、ホスホエノールピルビン酸、コハク酸、フマル酸、乳酸、及びピルビン酸等が挙げられるが、これらに限定されることはなく、例えば、アミノ酸類、テルペン類、アルカロイド類、及び核酸類などの任意の化合物であってもよい。

また、本発明の細胞抽出物の例として、細菌のエクストラクト、イースト・エクストラクト、ほ乳類組織抽出物(例えば、脳細胞抽出物等)等が挙げられる。

さらに、本発明の化合物カクテルは、遺伝子産物の関与する反応に必要な因子が含まれていれば、いかなるものを含んでもよい。例えば、遺伝子産物との反応系に関与する基質、ATPやNADHなどの補酵素、Fe、Mnなどの微量金属元素、 $MgCl_2$ 、 $MgSO_4$ 、NaCl及びKClなどの種々の無機塩類など、遺伝子産物が機能するために必要な因子を含んでもよい。化合物カクテルは、緩衝溶液に必要な因子を添加した再構成混合物でもよい。

[0015] 本発明は、具体的には、

- [1] 少なくとも一つの遺伝子産物を化合物カクテルに添加して反応させ、該化合物カクテルに生じる変化を検出することにより、該遺伝子産物の機能を同定する、遺伝子産物の機能同定方法；
- [2] 前記少なくとも一つの遺伝子産物は、該遺伝子産物をコードする少なくとも一つの遺伝子を発現させることにより得ることを特徴とする上記[1]に記載の遺伝子産物の機能同定方法；

- [3] 前記化合物カクテルは、代謝系化合物カクテルであることを特徴とする上記[1]または[2]に記載の遺伝子産物の機能同定方法；
- [4] 前記代謝系化合物カクテルは、フルクトース1, 6リン酸、6リン酸グルコネート、2, 3リン酸グリセレート、グルコース1リン酸、フルクトース6リン酸、グルコース6リン酸、リブロース5リン酸、リボース5リン酸、エリスロース4リン酸、イソクエン酸、クエン酸、2リン酸グリセレート、3リン酸グリセレート、シスアコニット酸、ホスホエノールピルビン酸、コハク酸、フマル酸、乳酸、及びピルビン酸から選ばれる化合物を含む、上記[3]に記載の遺伝子産物の機能同定方法；
- [5] 前記化合物カクテルは、細胞抽出物であることを特徴とする上記[1]または[2]に記載の遺伝子産物の機能同定方法；
- [6] キャピラリー電気泳動－質量分析装置(CE／MS)を用いて前記変化を検出することを特徴とする上記[1]～[5]のいずれかに記載の遺伝子産物の機能同定方法；
- [7] 少なくとも一つの遺伝子産物を化合物カクテルに添加して反応させ、該化合物カクテルに生じる変化を検出することにより、該遺伝子産物に結合する結合物質を同定する、遺伝子産物の結合物質同定方法；
- [8] 化合物カクテルを含むキットであって、少なくとも一つの遺伝子産物を化合物カクテルに添加して反応させ、該化合物カクテルに生じる変化を検出することにより、該遺伝子産物の機能を同定するためのキット；
- [9] 前記化合物カクテルは、代謝系化合物カクテルであることを特徴とする上記[8]に記載のキット；
- [10] 前記代謝系化合物カクテルは、フルクトース1, 6リン酸、6リン酸グルコネート、2, 3リン酸グリセレート、グルコース1リン酸、フルクトース6リン酸、グルコース6リン酸、リブロース5リン酸、リボース5リン酸、エリスロース4リン酸、イソクエン酸、クエン酸、2リン酸グリセレート、3リン酸グリセレート、シスアコニット酸、ホスホエノールピルビン酸、コハク酸、フマル酸、乳酸、及びピルビン酸から選ばれる化合物を含む、上記[9]に記載のキット；
- [11] 前記化合物カクテルは、細胞抽出物であることを特徴とする上記[8]に記載

のキット;ならびに

[12] 化合物カクテルを含むキットであって、少なくとも一つの遺伝子産物を化合物カクテルに添加して反応させ、該化合物カクテルに生じる変化を検出することにより、該遺伝子産物に結合する結合物質を同定するためのキットを提供するものである。

図面の簡単な説明

[0016] [図1]本発明の実施例において、CE／MSを用いて19種類の基質標準液(各100 μ M)の各代謝物質濃度を測定した結果を示すグラフである。

[図2]本発明の実施例において、19種類の基質標準液に機能が未知の遺伝子産物を添加して反応させた後、CE／MSを用いて各代謝物質濃度を測定した結果を、対照実験と比較して示すグラフである。

発明を実施するための最良の形態

[0017] 以下、上記知見に基づき完成した本発明の実施の形態を、例を挙げながら詳細に説明する。実施の形態及び実施例に特に説明がない場合には、J. Sambrook & D. W. Russell (Ed.), *Molecular Cloning: a laboratory manual* (3rd edition), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (2001); F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J.G. Seidman, J. A. Smith, K. Struhl (Ed.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons Ltd.などの標準的なプロトコール集に記載の方法、あるいはそれを修飾したり、改変した方法を用いる。また、市販の試薬キットや測定装置を用いている場合には、特に説明が無い場合、それらに添付のプロトコールを用いる。

[0018] なお、本発明の目的、特徴、利点、及びそのアイデアは、本明細書の記載により、当業者には明らかであり、本明細書の記載から、当業者であれば、容易に本発明を再現できる。以下に記載された発明の実施の形態及び具体的に実施例などは、本発明の好ましい実施態様を示すものであり、例示又は説明のために示されているのであって、本発明をそれらに限定するものではない。本明細書で開示されている本発明の意図並びに範囲内で、本明細書の記載に基づき、様々な改変並びに修飾ができることは、当業者にとって明らかである。

[0019] 遺伝子産物の機能同定方法(1) 遺伝子産物の生産

まず、機能を同定しようとする遺伝子産物、即ちタンパク質を生産する。

遺伝子産物の由来は特に限定されず、生物、組織、器官、細胞など、いずれの種類に由来するものであってよい。

目的の遺伝子産物を得るには、in vivoやin vitroで合成しても良いし、本来生物の有している(endogenous)遺伝子産物を細胞から精製してもよい。合成する場合、その遺伝子産物をコードする遺伝子が手元になければ、その遺伝子産物を化学的合成してもよいが、まず遺伝子を得てからin vivoあるいはin vitroで合成するのが好ましい。

遺伝子を得る方法としては、遺伝子産物のアミノ酸配列から、その遺伝子産物をコードするようなヌクレオチド配列を決定し、その配列を有するヌクレオチドを化学合成しても良い。遺伝子が長い場合、PCRやライブラリースクリーニングなどによって、そのcDNAをクローニングするのが好ましい。

[0020] クローニングした遺伝子を、発現ベクターに組み込み、大腸菌あるいは培養細胞で遺伝子産物を発現させ、精製する。また、in vitro転写系及びin vitro翻訳系を用いて遺伝子産物を合成し、そこから遺伝子産物を精製してもよい。

遺伝子産物の精製の程度は、用いる遺伝子産物の種類などにより適宜調節する。例えば、膜タンパクの場合、膜タンパクを機能させるため、細胞から粗精製して、膜に埋め込まれた形のまま用いてもよい。しかし、夾雑物を化合物カクテルに持ち込まない方がよいので、遺伝子産物を高度に精製するのが好ましい。

[0021] (2) 化合物カクテルへの遺伝子産物の添加

(1) に記載のようにして得られた遺伝子産物を化合物カクテルに添加する。

遺伝子産物は化合物カクテルに少なくとも一つ添加する。例えば、複数のタンパク質が相互作用をして機能することが明らかになっている場合、それら複数の遺伝子産物を一つの化合物カクテルに添加してもよい。

遺伝子産物を、濃度が $10^{-8} \mu\text{g}/\mu\text{l} \sim 10^3 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ の範囲となるように化合物カクテルに添加することができる。

ある反応系を対象とした化合物カクテルに、その反応系に関与する遺伝子産物を添加する場合、化合物カクテルは、基質、ATPやNADHなどの補酵素、Fe、Mnなどの微量金属元素、MgCl₂、NaClやKClなどの種々の無機塩類など、その遺伝子産物が機能するために必要な因子を含んでもよい。または、化合物カクテルはこれらの因子を含まず、反応前に適宜、これらの因子を化合物カクテルに添加してもよい。溶液は緩衝溶液であり、pHは中性付近、例えば6～8であることが好ましい。

なお、この化合物カクテルは、緩衝溶液に必要な因子を添加した再構成混合物でもよく、細胞から抽出した抽出物(extract)であってもよい。

[0022] (3) 遺伝子産物と化合物カクテルの反応

次に、遺伝子産物と化合物カクテルを反応させる。

遺伝子産物と化合物カクテルを、適切な温度や時間の条件で、反応させる。通常、37℃で、30分～2時間程度インキュベートするのが好ましい。

なお、遺伝子産物が酵素の場合は酵素反応、レセプターの場合は結合反応というように、添加した遺伝子産物により、生じる反応は異なる。

[0023] (4) 化合物カクテルにおける変化の検出

反応終了後、化合物カクテルに生じる変化を検出する。

検出前に予め、夾雑物(例えば、添加した遺伝子産物などのタンパク質)を除去しておく。夾雑物の除去には、物質を精製するために用いられる任意の方法、例えば限外濾過フィルター、クロマトグラフィーカラム、塩析、溶媒沈殿、溶媒抽出、蒸留、免疫沈降、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動法、透析、再結晶等を用いることができる。

化合物カクテルに含まれる化合物の変化を検出するためには、キャピラリー電気泳動-質量分析装置(CE/MS)、液体クロマトグラフィー-質量分析装置(LC/MS)、ガスクロマトグラフィー-質量分析装置(GC/MS)、フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析装置(FT-ICR-MS)、核磁気共鳴装置(NMR)などの分析装置を用いることができる。これらの分析装置を用いることによって、化合物カクテル中の各因子の量的変化を、一度に検出できるようになる。

[0024] (5) 遺伝子産物の機能の推定

最後に、量的変化を生じた化合物を同定し、添加した遺伝子産物の機能を推定する。

化合物カクテルとして、成分名が判明している化合物(因子)を添加して作製した再構成混合物を用いる場合、あらかじめ再構成混合物を、同条件で測定しておき、各因子の検出質量数、検出時間、ピーク面積などを調べておくことにより、量的変化した化合物を特定できる。また、化合物カクテルが抽出物である場合など、含まれる因子の成分名が不明であるときは、分析化学の常法によって、質量分析装置(MS/MS)やNMRから得られる構造情報、飛行時間型質量分析計(TOFMS)による精密質量数から得られる組成式、CE/MSやLC/MSの検出時間および代謝物質データベース等から、量的変化した化合物を同定することができる。

このようにして同定された、量的変化した化合物から、添加した遺伝子産物の機能が推定できる。

[0025] 本発明の適用例

化合物カクテルの典型的な例として代謝系化合物カクテルが挙げられる。さらに具体的な代謝系化合物カクテルの例としては、解糖系化合物カクテルやTCA回路化合物カクテルなどが考えられる。現在、こうした代謝系に関わる代謝物質は市販されており、目的の代謝系に関与する全ての代謝物質を化合物カクテルに添加する。代謝系化合物カクテルに含まれる化合物には、フルクトース1, 6リン酸、6リン酸グルコネート、2, 3リン酸グリセレート、グルコース1リン酸、フルクトース6リン酸、グルコース6リン酸、リブロース5リン酸、リボース5リン酸、エリスロース4リン酸、イソクエン酸、クエン酸、2リン酸グリセレート、3リン酸グリセレート、シスアコニット酸、ホスホエノールピルビン酸、コハク酸、フマル酸、乳酸、及びピルビン酸等が挙げられるが、これらに限定されることはない。対象の遺伝子産物が酵素である場合、この遺伝子産物が機能すれば、基質を生産物に変換する。従って、この酵素が働く代謝系の化合物カクテルにおいて、この遺伝子産物を添加すれば、反応後、基質が減少し、生産物が増加するという結果が得られることになる。この原理を利用して、様々な種類の代謝系化合物カクテルを準備しておき、機能の未知な遺伝子産物をそれらに添加して各代謝系化合物カクテル中の低分子化合物の変化を調べる。量が減少している化合物A及

び増加している化合物Bがあれば、その遺伝子産物は、当該代謝系においてAをBに変換する機能を有していることが示唆される。

[0026] 対象の遺伝子産物が低分子化合物の結合タンパク質である場合、化合物カクテル中にその結合物質である低分子化合物が存在していれば、遺伝子産物はその結合物質に結合し、反応後、遊離した結合物質は減少することになる。従って、反応後、量が減少している化合物は、その遺伝子産物の結合物質である可能性が高く、例えばこの系を用いれば、あるレセプターが結合する低分子リガンドを明らかにすることができる。

[0027] 添加する遺伝子産物は、複数でもよい。例えば、遺伝的相互作用があることが明らかになっていたり、生化学的に互いに結合することが明らかになっていたりするような複数の遺伝子産物を添加してもよい。これらの遺伝子産物が四次構造を作つて酵素活性や結合活性などの機能を有する場合、それらと一緒に添加して初めて、化合物カクテル中の因子の量に違いが現れることになる。また、それら複数の遺伝子産物が、独立した反応に関わっている場合、反応後に変化する因子は、2つとは限らず、3つ以上になることがある。

[0028] 用いる化合物カクテルは、細胞の抽出物でもよい。例えば、細菌のエクストラクト、イースト・エクストラクト、ほ乳類組織抽出物(例えば、脳細胞抽出物など)などが挙げられるが、これらに限定されず、遺伝子産物の関与する反応に必要な因子が含まれていれば、どんなものでもよい。

なお、本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

実施例

[0029] 以下、実施例として、機能が未知の大腸菌遺伝子産物の機能を同定した実験例を詳細に記載するが、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

[0030] 化合物カクテルとして、解糖系、TCA回路、ペントースリン酸回路に関わる19種類の基質化合物(フルクトース1, 6リン酸(F16P)、6リン酸グルコネート(6PG)、2, 3リン酸グリセレート(23DPG)、グルコース1リン酸(G1P)、フルクトース6リン酸(F6P)、グルコース6リン酸(G6P)、リブロース5リン酸(Ribulose5P)、リボース5リン酸(Ribo

se5P)、エリスロース4リン酸(Erythrose4P)、イソクエン酸(iso-Citrate)、クエン酸(Citrate)、2リン酸グリセレート、3リン酸グリセレート(2PG／3PG)、シスアコニット酸(cis-Aconitase)、ホスホエノールピルビン酸(PEP)、コハク酸(Succinate)、フマル酸(Fumarate)、乳酸(Lactate)、及びピルビン酸(Pyruvate))(各100 μ M、以下、かつて内は最終濃度を表す)、NADH(500 μ M)、MgSO₄(10mM)、KCl(10mM)を含むHEPES緩衝液(5mM、pH7.5)100 μ lを用いた。

[0031] 一方、上記代謝経路に関与している可能性が示唆されている遺伝子を、His-tagの付いた原核生物発現ベクターにクローニングし、IPTGでその遺伝子の発現を誘導した。その後、集菌し、大腸菌のペレットを超音波粉碎し、コバルトカラムにかけ、His-tagを介してタンパク質を結合させた。カラムを20mMのイミダゾールで洗浄後、HEPES溶出液(150mM イミダゾール—300mM NaCl—50mM Hepes pH7.0)でタンパク質を回収した。電気泳動で純度を確認した後、目的のタンパク質を含む溶出液を脱塩・濃縮し、実験に使用するまで—20°Cで保存した。

[0032] 精製したタンパク質1 μ gを上記化合物カクテルに添加し、37°C、30分インキュベートした。直ちに、限外濾過フィルターを用いてタンパク質を除去した後、キャピラリー電気泳動—質量分析装置(CE／MS)を用いて反応液を分析した。対照実験として、上記遺伝子産物を添加しないが、他の条件は全て同様にした反応を行った。

[0033] CE／MSの使用方法は、文献(日本特許公報第3341765号、Soga T. et al. Anal Chem. 74, 2233-2239, 2002)の記載に従った。以下、測定条件などを記載する。キャピラリーには、内径50 μ m、外径350 μ m、全長90cmのSMILE(+)キャピラリーを用い、泳動緩衝液には、50mM酢酸アンモニウム(pH8.5)を用いた。高電圧電源による白金電極への印加電圧は—30kV、キャピラリーの温度は20°Cとして測定した。試料は加圧法を用いて、50mbarで30秒間注入した。質量分析装置としては、エレクトロスプレーイオン化質量分析装置(ESI-MS)を用いた。MS側の電極を陽極にして、陰イオンを選択的にMSに導入する負イオンモードを用い、負イオンモードでキャピラリーに印加するキャピラリー電圧は4000V、イオンを加速して窒素ガスに衝突させ、フラグメント(その物質の断片)イオンを生成するために、コーン部分にかかるフラグメンター電圧は100Vに設定した。CEから入ってきた溶媒を揮発させるた

めに用いるドライイングガスには窒素を用い、ガスの温度は300°Cで測定した。シース液には5mM酢酸アンモニウム含有50%メタノールを用い、流速毎分10 μ lで送液した。参考例として、本条件で19種類の基質標準液(各100 μ M)を測定した結果を図1に示す。各化合物は、その物質固有の質量数(m/z)で検出されている。

[0034] この19種類の基質標準液に、上記遺伝子産物を添加して反応させた実験結果を、対照実験と比較して、図2に示す。対照実験である上記遺伝子産物不添加の場合に比べ、遺伝子産物を添加すると、ピルビン酸濃度の著しい減少と乳酸濃度の増加が観察された。この結果は、添加した遺伝子産物がピルビン酸を乳酸に変換する活性を持つことを示唆し、この遺伝子産物が乳酸デヒドロゲナーゼであることが示された。

産業上の利用可能性

[0035] 本発明によると、広範な生物種に対し応用範囲の広い、機能が未知である遺伝子産物の機能同定のための方法及びキットを提供することができる。さらに、本発明は、機能が未知である遺伝子産物の結合物質同定のための方法及びキットを提供することができる。

請求の範囲

- [1] 少なくとも一つの遺伝子産物を化合物カクテルに添加して反応させ、該化合物カクテルに生じる変化を検出することにより、該遺伝子産物の機能を同定する、遺伝子産物の機能同定方法。
- [2] 前記少なくとも一つの遺伝子産物は、該遺伝子産物をコードする少なくとも一つの遺伝子を発現させることにより得ることを特徴とする請求項1に記載の遺伝子産物の機能同定方法。
- [3] 前記化合物カクテルは、代謝系化合物カクテルであることを特徴とする請求項1または2に記載の遺伝子産物の機能同定方法。
- [4] 前記代謝系化合物カクテルは、フルクトース1, 6リン酸、6リン酸グルコネート、2, 3リン酸グリセレート、グルコース1リン酸、フルクトース6リン酸、グルコース6リン酸、リブロース5リン酸、リボース5リン酸、エリスロース4リン酸、イソクエン酸、クエン酸、2リン酸グリセレート、3リン酸グリセレート、シスアコニット酸、ホスホエノールピルビン酸、コハク酸、フマル酸、乳酸、及びピルビン酸から選ばれる化合物を含む、請求項3に記載の遺伝子産物の機能同定方法。
- [5] 前記化合物カクテルは、細胞抽出物であることを特徴とする請求項1または2に記載の遺伝子産物の機能同定方法。
- [6] キャピラリー電気泳動-質量分析装置(CE/MS)を用いて前記変化を検出することを特徴とする請求項1～5のいずれかに記載の遺伝子産物の機能同定方法。
- [7] 少なくとも一つの遺伝子産物を化合物カクテルに添加して反応させ、該化合物カクテルに生じる変化を検出することにより、該遺伝子産物に結合する結合物質を同定する、遺伝子産物の結合物質同定方法。
- [8] 化合物カクテルを含むキットであって、少なくとも一つの遺伝子産物を化合物カクテルに添加して反応させ、該化合物カクテルに生じる変化を検出することにより、該遺伝子産物の機能を同定するためのキット。
- [9] 前記化合物カクテルは、代謝系化合物カクテルであることを特徴とする請求項8に記載のキット。
- [10] 前記代謝系化合物カクテルは、フルクトース1, 6リン酸、6リン酸グルコネート、2, 3

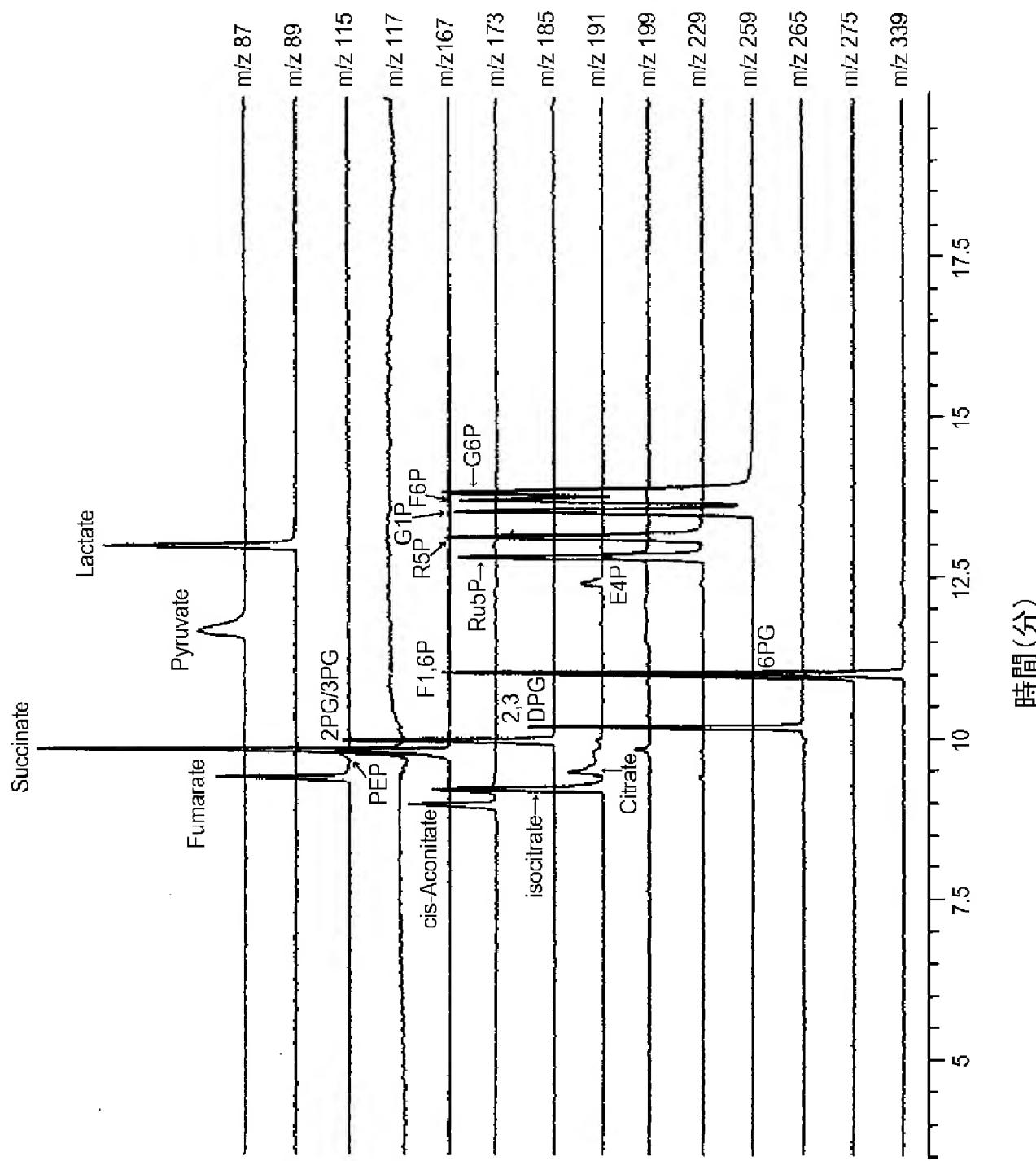
リン酸グリセレート、グルコース1リン酸、フルクトース6リン酸、グルコース6リン酸、リブロース5リン酸、リボース5リン酸、エリスロース4リン酸、イソクエン酸、クエン酸、2リン酸グリセレート、3リン酸グリセレート、シスアコニット酸、ホスホエノールピルビン酸、コハク酸、フマル酸、乳酸、及びピルビン酸から選ばれる化合物を含む、請求項9に記載のキット。

[11] 前記化合物カクテルは、細胞抽出物であることを特徴とする請求項8に記載のキット。

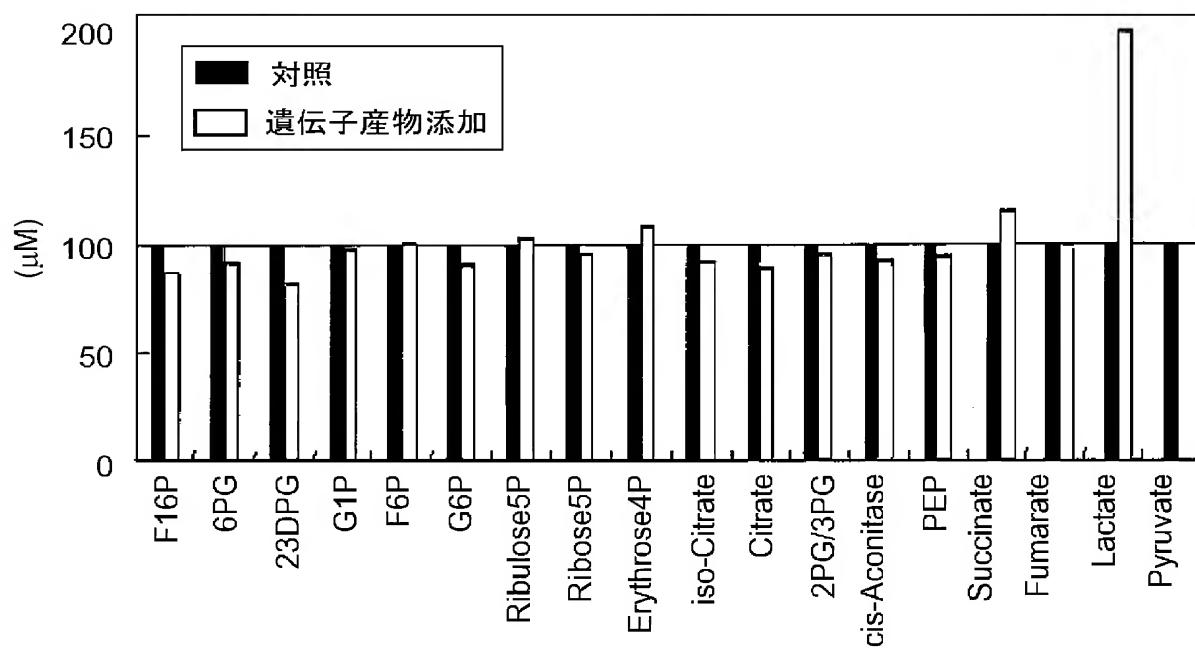
◦

[12] 化合物カクテルを含むキットであって、少なくとも一つの遺伝子産物を化合物カクテルに添加して反応させ、該化合物カクテルに生じる変化を検出することにより、該遺伝子産物に結合する結合物質を同定するためのキット。

[図1]



[図2]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/001858

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ G01N33/68, 27/447, 27/62, C12Q1/68//C12N15/09, C12P21/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ G01N33/68, 27/447, 27/62, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, PubMed, JSTPlus (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 2000-501606 A (RECOMBINANT BIOCATALYSIS, INC.), 15 February, 2000 (15.02.00), & WO 9720918 A1 & AU 9711489 A & EP 866853 A1 & US 5939250 A & US 5962283 A	<u>1-3, 7-9, 12</u> <u>4-6, 10, 11</u>
Y	Tomoyoshi SOGA et al., "Dynamic na Seimei Gensho no Metabolome Kaiseki Gijutsu", Cell Technology (2003), Vol.22, No.12, pages 1337 to 1341	1-11
Y	Kazuki SAITO, "Shokubutsu Metabolomics", Protein, Nucleic acid and Enzyme (2003), Vol.48, No.15, pages 2199 to 2204	1-11

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
12 May, 2005 (12.05.05)

Date of mailing of the international search report
31 May, 2005 (31.05.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.7 G01N33/68, 27/447, 27/62, C12Q1/68 // C12N15/09, C12P21/02

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.7 G01N33/68, 27/447, 27/62, C12Q1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI, PubMed, JSTPlus(JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	J P 2000-501606 A (リコンピナントバイオカタリシス インコ-ホーレーテッド) 2000.02.15 & WO 9720918 A1 & AU 9711489 A & EP 866853 A1 & US 5939250 A & US 5962283 A	1-3, 7-9, 12 4-6, 10, 11

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 12.05.2005	国際調査報告の発送日 31.5.2005		
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 上條 肇 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B	9453

C (続き) 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	曾我朋義 他, ダイナミックな生命現象のメタボローム解析技術, 細胞工学 (2003), Vol. 22, No. 12, p. 1337-1341	1-11
Y	齊藤和季, 植物メタボロミクス, 蛋白質 核酸 酵素 (2003), Vol. 48, No. 15, p. 2199-2204	1-11